METHOD AND SYSTEM FOR DISTRIBUTING AREA ADVERTISEMENT INFORMATION, AND PORTABLE TERMINAL INSTALLED WITH THE SYSTEM

Publication number: JP2003016347 Publication date:

Inventor:

2003-01-17

SHIBATA SHUICHI

Applicant:

NIPPON ELECTRIC CO

Classification:

- international:

G06Q30/00; G06F13/00; G06F17/30; G06Q10/00; G06Q50/00; H04H1/00; H04Q7/38; G06Q30/00: G06F13/00; G06F17/30; G06Q10/00; G06Q50/00; H04H1/00; H04Q7/38; (IPC1-7): G06F17/60; G06F13/00; G06F17/30; H04H1/00; H04Q7/38

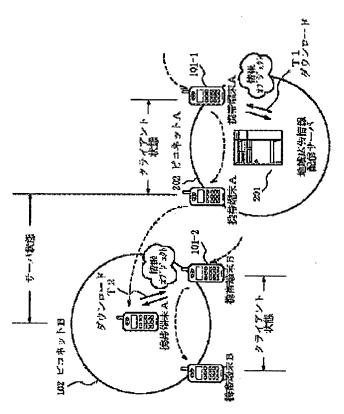
- European:

Application number: JP20010200906 20010702 Priority number(s): JP20010200906 20010702

Report a data error here

Abstract of JP2003016347

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method and a system for distributing area advertisement information, to which a portable terminal (portable telephone, PHS terminal, PDA, etc.), with a short-distance radio function is applied, and to provide the portable terminal installed with the system. SOLUTION: This system is equipped with an area advertisement information distribution server which distributes an information object of advertisement information regarding a specific area by short-distance radio and a plurality of radio terminals which receive the information object distributed by the area advertisement information distribution server by shortdistance radio and distribute the information object to other portable terminals by shortdistance radio. One portable terminals which has received the information object accesses URI entered into an area advertisement information distribution server location as a held parameter of the information object through a portable telephone network to obtain detailed information of the advertisement information.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

http://v3.espacenet.com/textdoc?DB=EPODOC&IDX=JP2003016347&F=0

(19) 日本国特許庁(JP)

再 公 表 特 許(A1)

(11) 国際公開番号 W02003/016347

発行日 平成16年12月2日 (2004.12.2)

(43) 国際公開日 平成15年2月27日(2003.2.27)

(51) Int.C1.⁷

C12P 21/06

FΙ

C 1 2 P 21/06

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 15 頁)

出願番号	特願2003-521269 (P2003-521269)	(71) 出願人	000173555
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/008042		財団法人化学及血清療法研究所
(22) 国際出願日	平成14年8月7日 (2002.8.7)		熊本県熊本市大窪一丁目6番1号
(31) 優先権主張番号	特願2001-242093 (P2001-242093)	(74) 代理人	100068526
(32) 優先日	平成13年8月9日 (2001.8.9)		弁理士 田村 恭生
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100076521
(81) 指定国	EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,		弁理士 坪井 有四郎
ES, F1, FR, GB, GR, IE,	IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR) , AU, CA, J	(74) 代理人	100126778
P, US			弁理士 品川 永敏
		(72) 発明者	亀井 慎太郎
			熊本県熊本市江澤1-694
		(72) 発明者	濱本 高義
	•		熊本県熊本市麻生田1999-8
		(72) 発明者	平嶋 正樹
			熊本県菊池郡西合志町須屋2629-5
		İ	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞死抑制活性を有するペプチド断片を調製する方法

(57)【要約】

細胞死抑制活性を有するペプチド断片を調製する方法を提供する。細胞死抑制活性を有するセレノプロテインP断片を得るために、全長型分子に種々のセリンプロテアーゼを作用させ、その結果を電気泳動および細胞死抑制活性で評価した。活性を示す、電気泳動で分子量3.5万以下のバンドを生成する酵素を明らかにすることにより、セレノプロテインP断片を調製する方法を明らかにした。本願発明の細胞死抑制活性を有するペプチド断片の調製方法は、細胞死に起因する疾患の軽減、治療、予防並びに培養細胞における有用生体物質の生産の効率化等に利用され得る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

セレノプロテイン P または当該タンパク質含有画分にセリンプロテアーゼを作用させることを特徴とする、細胞死抑制活性を有するペプチド断片の調製方法。

【請求項2】

前記セリンプロテアーゼが、血漿カリクレイン、factor XIIa、factor XIa、factor XIa、factor VIIa、トロンピン、プラスミン、組織プラスミノーゲンアクチベーター、ウロキナーゼ、トリプシンおよび好中球エラスターゼよりなる群から選択される請求項1記載の調製方法。

【請求項3】

前記セリンプロテアーゼが、血漿カリクレイン、factor XIIa、factor XIaまたはプラスミンである請求項2記載の調製方法。

【請求項4】

セレノプロテイン P に対し重量比 1 / 1 0 以下のセリンプロテアーゼを添加し、ついで 3 7 ℃にて 1 5 分~ 2 4 時間保温することを含む、請求項 1 から請求項 3 のいずれかに記載の調製方法。

【請求項5】

セレノプロテインPより細胞死抑制活性を有するペプチド断片を生成せしめるための、血 漿カリクレイン、factor XIIa、factor XIa、factor Xa 、factor IXa、factor VIIa、トロンピン、プラスミン、組織プラ スミノーゲンアクチベーター、ウロキナーゼ、トリプシンおよび好中球エラスターゼより 選択されるセリンプロテアーゼの使用。

【請求項6】

該セリンプロテアーゼが、血漿カリクレイン、factor XIIa、factor XIaまたはプラスミンである請求項5記載の使用。

【請求項7】

セレノプロテインPまたはセレノプロテインP含有画分にセリンプロテアーゼを作用させてセレノプロテインP断片含有溶液を得、ついで該セレノプロテインP断片含有溶液を、ゲルろ過クロマトグラフィー、抗セレノプロテインP断片モノクローナル抗体をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィー、および/または金属キレートクロマトグラフィーに供することを含む、細胞死抑制活性を有するペプチド断片の精製方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本願発明は、医療用医薬品および試薬の分野に属し、新たな機能を有するタンパク質の調製方法に関する。詳細には、細胞死抑制活性を有するタンパク質あるいはその断片から、より活性の強いペプチド断片またはペプチド断片群を調製する方法に関する。さらに詳細には、断片化の方法として、酵素を用いた加水分解反応を利用し、強い細胞死抑制活性を有する分子量3.5万以下のペプチド断片またはペプチド断片群を調製する方法に関する。当該方法は、細胞死抑制活性を有するタンパク質の大量調製に用いられ、種々の疾患、たとえば細胞死に関連した疾患に対する病態悪化阻止、予防または治療剤を調製する際に効果的に使用され得る。

背景技術

細胞死は、高等生物の神経系、内分泌系、免疫系における基本的な制御に重要な働きをしているばかりでなく、多くの疾病に深く関わっていることが指摘されている(Thompson С. В., Science, vol. 267, p. 1456-1462(1995))。たとえば、全身性エリテマトーデスのような自己免疫疾患、神経細胞死による神経変性疾患、臓器移植に伴う臓器移植傷害等、これらはアポトーシスが関与する細胞死の影響による疾患として捉えることができる。

細胞を培養する際、主として培養細胞自身に由来、もしくは添加物に由来する物質による 細胞に対するストレスが原因で細胞死が誘導されるが、同じ条件で全ての細胞に対する細 10

30

胞死が誘導されるわけではない。通常、そのような環境に適応する細胞には、ストレスによる細胞死誘導シグナルを閾値以下に保つために必要なタンパク質が、細胞内外にすで因子、合成酵素、酸化還元酵素、リン酸化酵素、脱リン酸化酵素、転移酵素、配力である。それらのタンパク質としては転写アポトーシス抑制タンパク質等が考えられる。つまり、個々の細胞でストレスに対するると性に差が生じるのは、それらのタンパク質の発現量に差があるためであると予想される。そこで、細胞死の機序がそれぞれ異なるにせよ、あるストレスによる細胞死に対していた場であれば、培養細胞の場合だけではなく、生体内でも同様のストレスが生じた場合に起こる細胞死を抑制することが可能と考えられる。

10

ある種の培養細胞を無血清培養したとき、血清アルブミン画分を添加して培養すると、これに含まれる脂肪酸がストレスとなり、この細胞に細胞死を誘導させることができる。この細胞死は、ヒト血漿を添加することによって抑制することができ、最近ヒト血漿からその活性物質が単離、同定された。この物質は、セレノプロテインPと呼ばれるセレニウム含有タンパク質のカルボキシル末端(以下「C末端」と略す)領域の断片であった(再公表公報WO 00/31131(平成10年特許願第347863号))。 発明の開示

(発明が解決しようとする技術的課題)

血漿中のセレノプロテインPは、分子量約6万の糖タンパク質で、10残基のセレノシステインを含むと考えられている。セレノプロテインPは、大きく2つのドメインと、するも過酸化脂質還元能を持ち一つのセレノシステインを含んだN末端側のドメインと、残るりつのセレノシステインを含みセレン伝搬機能を有することが示唆されているC末端側のドメインに分かれている。さらにこれらドメインの間には2つのヒスチジン残基に富む領域があり、これを介して細胞表面の陰性荷電リン脂質やヘパリンなど硫酸化プロテオグリカンに結合すると考えられている(Saito Y.et al.,J.HealthScience,vol.46,p.409-413(2000))。前述のヒト血漿から得られたセレノプロテインP断片は、このヒスチジン残基に富む領域を含まないC末端側のペプチド断片であった。

30

20

ところで、上記セレノプロテインPのC末端側断片の単離・同定に際して細胞死抑制活性のスクリーニング方法として好適に用いられた系は、アルブミン添加無血清培地を用いた、ヒト巨核芽球系のDami細胞の培養系であった。Dami細胞はRPMI 1640、D-MEM、F-12を等量混合した培地(0.1%BSAおよび0.05μMB-メルカプトエタノール含)により継代可能であるが、アルブミン不含培地ではほとんど増殖しない。この時、培地中に0.01から0.5%のヒト血清アルブミンが存在する条件下では、細胞は正常に増殖するが、4日目以降に全ての細胞が突然死する。この培養系に試料を添加することによって、試料に含まれる細胞死抑制活性を測定することが可能である

40

また、単離、同定されたセレノプロテインP断片を抗原として、モノクローナル抗体を作製し、これを用いた簡便な精製方法も確立された。当該モノクローナル抗体を用いた簡便な精製方法は、ヒト正常血漿のヘパリン吸着画分を原料とし、硫安分画、当該モノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィー精製からなる。この方法で精製した場合も、セレノプロテインPは精製工程中に断片化を受け、非選元条件下のSDS-PAGEで分子量3.5万以下に相当するバンドをからなる一連のタンパク質群として精製れた。これらのバンドについて、タンパク質のアミノ末端(以下、「N末端」と略す)配列解析を実施したところ、260位のリジン残基に始まる分子と、292位のトレオニン残基から始まる分子が含まれていた。

驚くべきことに、このセレノプロテインPのC末端側の断片は、完全長のセレノプロテインPに比較して、より高い細胞死抑制活性を有していた。しかし、セレノプロテインPは、上述の精製工程中に、ヒト血漿に由来する何らかの酵素で限定分解されたものと考えられたが、その酵素がどのようなものであるかまったく不明であった。また、精製したセレ

ノプロテインP断片は単一の分子としてではなく、数本のバンドとして得られたため、い ずれの分子が高い細胞死抑制活性を有するのか不明であった。さらに、このような方法で 得られたセレノプロテインP断片は、調製ごとに含まれる各パンドの割合が変わり、再現 性に乏しかった。このような、強力な細胞死抑制活性を持つセレノプロテインP断片を医 薬品に応用するためには、これらセレノプロテインP断片化の過程を制御し、安定かつ恒 常的に一定の品質のものを調製する方法が切望された。

(その解決方法)

前述のごとく、セレノプロテインPは精製工程で限定分解を受けて断片化されるが、本願 発明者らは、いかなる酵素がこれに関与しているかを調査するため、まず、精製工程に種 々の酵素阻害剤を導入して調べた。鋭意検討の結果、セリンプロテアーゼの特異的かつ強 力なインヒビターとして知られる、ジイソプロピルフルオロリン酸(DFP)を用いるこ とで、セレノプロテインPの断片化が完全に抑制されるという知見を見出した。従って、 この断片化にはセリンプロテアーゼ、もしくはこれによって二次的に活性化される何らか のプロテアーゼが深く関与していると考えられた。

次に所望の酵素を検索するために、本願発明者らは血漿中に含まれるセリンプロテアーゼ に着目し、これらをセレノプロテインPと反応させ、いかなる酵素がセレノプロテインP を限定分解するかを検索した。基質であるセレノプロテインPに対して、重量比で10分 の1となるように各種酵素を添加し、一定時間反応させた後、一部をSDS-PAGE処 理液にて処理し、非還元条件下で電気泳動した。セレノプロテインPを限定分解している かを、クマシーブリリアントブルーで染色して観察した。セリンプロテアーゼとしては、 血漿カリクレイン、factor XIIa、factor XIa、factor X a、factor IXa、factor VIIa、トロンピン、プラスミン、組織プ ラスミノーゲンアクチベーター、ウロキナーゼ、トリプシン、好中球エラスターゼを用い た。

その結果、分解の程度に差はあるものの、用いた大部分のセリンプロテアーゼ処理によっ て、分子量3.5万以下に相当するバンドの出現が確認された。このことは、セレノプロ テインPのある特定の領域に、セリンプロテアーゼに鋭敏な部位が存在することを示唆し

また、これらセリンプロテアーゼの中でも、とりわけ血漿カリクレイン、factor XIIa、factor XIa、プラスミンはセレノプロテインPを効率的に分解する ことが判明した。これらの酵素の反応条件は、通常酵素反応に用いられる条件であれば特 に限定するものではなく、添加する酵素の量によって反応時間を制御することも、逆に反 応時間によって添加する酵素の量を制御することも可能である。好適な一例としては、基 質であるセレノプロテインPに対し重量比1/10以下、例えば重量比約1/20量の酵 素を添加し、37℃にて15分~24時間保温することによって、所望のセレノプロテイ ンP断片を生成させることができる。

また、こうして得られた反応産物は、切断前に比較して、明らかに細胞死抑制活性が上昇 しており、所望のセレノプロテインP断片が生成していることが確認された。 発明を実施するための最良の形態

本発明によって供された、酵素を利用したセレノプロテインP断片調製方法は、前述のよ うに特に何らかの切断操作を行わず、再現性に問題のあったセレノプロテインP断片調製 とは異なり、その断片化の過程を制御することを初めて可能とする。

さらに、こうして得られた反応産物を出発材料にして、通常用いられるクロマトグラフィ ーの手法を組み合わせることにより、所望のセレノプロテインP断片の精製が可能である 。クロマトグラフィーの手法としては、通常用いられる手法が適用され特に限定されるも のではないが、たとえばゲルろ過や限外濾過膜分画など分子量の差を利用する方法の他、 イオン交換、疎水、逆相、アフィニティー、金属キレート等のクロマトグラフィーを用い た手法等、いずれの方法でも好適である。

より好適には、ゲルろ過クロマトグラフィーを利用して、分子量3.5万以下のセレノプ ロテインP断片を精製する方法、あるいはセレノプロテインP断片に特異的に結合するモ 10

20

10

20

30

40

ノクローナル抗体をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーが利用される。また、金属キレートクロマトグラフィーを利用すれば、所望のセレノプロテインP断片がヒスチジンに富む領域を実質的に欠失していることを利用して、未切断のセレノプロテインPと分離することが可能である。好適には、これらを組み合わせて用いることによって、効率的に所望のセレノプロテインP断片の精製が可能となる。

以上述べた方法を用いることによって、所望のセレノプロテイン P 断片を一定の品質で、 安定かつ恒常的に生産することがはじめて可能となった。

以下に、本発明をより明確に特徴づけるために実施例を用いて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限られるものではない。

実施例1

(完全長セレノプロテイン P の精製)

血漿からのセレノプロテインPの精製は、Saito Y. et al., J. Biol. Chem., vol. 274, p. 2866-2871 (1999) に準じて以下のように行った。

ヒト新鮮凍結血漿 2 リットルを温浴槽内で完全に融解し、低温室に置いた。これにPEG40000100gを少量ずつ添加しながら撹拌し、全量添加後さらに1時間撹拌を続けた。これを10,000gにて20分間遠心した。上清を回収し、AP25 (ミリポア)にてろ過した。ヘパリンセファローズ(アマシャムファルマシアバイオテク)100mLを充填したカラムを、あらかじめ20mMリン酸緩衝液(20mMリン酸(pH7.4)、0.15M、0.2mM EDTA)で平衡化し、これに得られたろ液を全量アプライした。20倍量の平衡化バッファーで洗浄した後、塩濃度を0.15Mから0.6Mまでの濃度勾配を作製することによって、吸着タンパク質をグラジエント溶出した。溶出のでの濃度勾配を作製することによって、吸着タンパク質をグラジエント溶出した。溶出のは5mLずつ分取し、各フラクションに含まれるセレノプロテインPの量をELISAで確認し、セレノプロテインPを含むフラクションをプールした。精製工程中におけるセレノプロテインP断片化を避けるため、DFPを終濃度5mMとなるよう添加した。

次に、この画分を20mMトリス緩衝液(20mM Tris-HCl(pH8))で6倍に希釈した。この段階で総量0. $75\sim1$ Lとなった。これを、同じ20mMトリス緩衝液で平衡化した40mLのQセファローズ(アマシャムファルマシアバイオテク)カラムにアプライした。 $250\sim300m$ Lの平衡化バッファーで洗浄し、塩濃度0. 25Mまでのグラジエントで溶出した。グラジエントには250mLの緩衝液を用いた。得られたフラクションをELISAで定量し、セレノプロテインPを含むフラクションをプールした。また、このプール画分にも、DFPを終濃度5mMとなるよう添加した。

引き続き、得られたプール画分に、終濃度2mMとなるようイミダゾールを添加し、4mLのNiーNTAアガロースゲル(キアゲン)カラムにアプライした。このカラムは、あらかじめ20mMトリス緩衝液(20mM TrisーHCl(pH8)、2mMイミダゾール)で平衡化した。アプライ終了後、洗浄バッファー(20mM TrisーHCl(pH8)、20mMイミダゾール、1M NaCl)30mLで洗浄し、溶出バッファー(20mM TrisーHCl(pH8)、150mMイミダゾール、1M NaCl)で溶出した。溶出画分は1mLずつ分取し、280nmの吸光度で、吸収の観察されたとで溶出した。この適分を、2.5mLまでSpeedVac(SARVANT)を用いて遠心濃縮した。この濃縮画分にも、DFPを終濃度5mMとなるよう添加した。ヘパリンセファローズクロマトグラフィーからNi-NTAアガロース溶出画分までの精製収量を下の表1に示した。

20

30

表1

Step	Volume	ELISA	Total antigen	Yields
	(mL)	$(\mu g/m L)$	(mg)	(%)
Heparin Sepharose	2000	2. 4	4.8	100, 0
Q-Sepharose	1920	2. 7	5. 1	106. 3
Ni-NTA agarose	133	18.6	2.5	51.5
Eluate	10.5	227. 0	2. 4	49.6

最後に、濃縮したセレノプロテインP画分は、リン酸緩衝液で平衡化したPD-10カラム(アマシャムファルマシアパイオテク)にアプライし、脱塩、パッファー置換した。こうして得られたセレノプロテインPは、SDS-PAGEで、分子量約67,000の移動度を示し、そのほとんどが全長型のセレノプロテインPと考えられた。これを以降の切断酵素を検索する実験に用いた。

実施例2

(全長セレノプロテイン P の酵素消化)

この実験の結果、いずれのプロテアーゼによっても、強い細胞死抑制活性を持つセレノプロテインP断片(再公表公報WO 00/31131(平成10年特許願第347863号))と近似した、分子量1万~3.5万以下のバンドの出現が認められた。また、未消化のセレノプロテインPの残存量から、これら酵素の中でも、特に血漿カリクレイン、factor XIIa、factor XIIa、プラスミンが効率よくセレノプロテインPを消化することが判明した。

実施例3

(セレノプロテイン P 断片の細胞死抑制活性)

実施例2で得られた試料に含まれるセレノプロテインP断片が、全長セレノプロテインPに比較して、その細胞死抑制活性が増強しているかを確認するため、以下に述べる細胞死抑制活性測定系で評価した。

 0.05μ M β - メルカプトエタノールおよび 0.1% B S A を含有する無血清培地 S F O 3(三光純薬社製)で継代可能な D a m i 細胞(G r e e n b e r g S. M. e t a l., B l o o d v o l. 7 2, p. 1968-1977 (1988): 1×10^6 c e l l / d i s h / 3 m L)の 1 m L に、R P M I 1640/D - M E M / F - 12 の 1: 2: 2 混合培地(S A 培地)を 2 m L 添加後、3 日間培養し、測定時に当該細胞を回収した。回収した細胞を、4 μ M リノール酸を含む S A / 0. 0.5% 脱脂 B S A (S I G M A 社製)により 2 回洗浄し、同培地で 3×10^4 c e l l / m L になるように懸濁後、 2 の細胞懸濁液を試料添加ウェルのみ 2 0.0μ L、段階希釈のためのウェルには 1 0.0μ L ずつ、96 w e l l プレートに分注した。サンプル添加ウェルに、試料を 2μ L 添加して撹拌した後、100 μ L 細胞懸濁液が入ったウェルに対して段階希釈した。 3 7% の C 0.0μ C 0.0μ L 細胞懸濁液が入ったウェルに対して段階希釈した。 3 0.0μ C 0.0μ C 0.0μ L 細胞懸濁液が入ったウェルに対して段階系の系では

培養4日目以降、活性のない試料を添加したwellの細胞は死滅し、活性のある試料を添加したwellの細胞は生存し続けるので、評価の尺度としては、生細胞が被検試料の何倍希釈まで存在するか、という希釈倍率を用いた。従って、以下の表記で、数値が高いほど細胞死抑制活性が高い。

実施例2で得られた、セレノプロテインP断片を含む試料では、全長セレノプロテインPに比較して、少なくとも希釈倍率で1.5~3倍の活性上昇が観察された。このことから、本発明で用いた前述の酵素で、実際に強い細胞死抑制活性を有するセレノプロテインP断片の調製が可能であることが示された。

表2

切断に用いた	細胞死抑制活性
酵素名	(希釈倍率)
SeP未処理	400
血漿カリクレイン	1200
Factor XIIa	600
Factor Xia	800
Factor Xa	800
Factor Ixa	600
Thrombin	600
Plasmin	600
Activated PC	800
Elastase	600
Trypsin	600

実施例4

(全長セレノプロテイン P のカリクレインとプラスミンによる消化実験)

実際にセレノプロテインP断片を調製するに当たり、セレノプロテインPに反応させると 素の量、反応時間などはそれぞれの酵素の基質に対する効率に依存する。そこで、セレバスロテインP断片の酵素消化効率について、血漿カリクレインとプラスミンを取り上ば、酵素消化を継時的に観察することにより、その特徴を明らかにした。酵素の添加量に、 実施例2に準じた。血漿カリクレインでは、反応開始から0、2、4、6、8、10、12 および24時間後に、プラスミンでは反応開始から0、5、10、15、20、25、30および60分後に、それぞれ検体を採取し、SDSーPAGEで電気泳動して、断の進行の程度を観察した。図2に当該SDSーPAGEの電気泳動像を示す。その結果に位するセレノプロテインP断片の生成が観察された。

この結果、断片調製に用いる酵素の種類に応じた反応条件を適宜設定することにより、所望のセレノプロテインP断片を調製することが可能であることが示された。

(セレノプロテインP断片の精製方法)

酵素による限定分解によって生じたセレノプロテインP断片は、以下の方法で精製可能である。強い細胞死抑制活性を持つセレノプロテインP断片(セレノプロテインPのC末端側分子)は、セレノプロテインPのヒスチジン残基に富む領域を実質的に欠失しているために、金属キレートカラムへの結合能を失っている。これを利用することで、セレノプロテインPのC末端側分子の調製が可能である。

まず、セレノプロテインPの1mgに対し、血漿カリクレイン50μgを添加し、37℃にて24時間反応させ、セレノプロテインPを限定分解させた。反応終了時にDFPを終濃度1mMとなるよう添加して、カリクレインを失活させた。これに終濃度2mMとなるようイミダゾールを添加し、あらかじめ平衡化バッファー(20mM Tris−HCl、2mMイミダゾール(pH8))で平衡化しておいた3mLのNi−NTAアガロース

10

20

__

40

ゲルヘアプライした。さらに、洗浄バッファー(20mM TrisーHC1、20mM イミダゾール、1M NaC1(pH8))30mLでカラムを洗浄し、これら非吸着画分および洗浄画分を回収した。カリクレインで限定分解された後に生ずる、セレノプロテインP断片のC末端側の分子は、実質的にヒスチジンに富む領域を欠失しているため、NI-NTAアガロースゲルへ結合しない。そのため、目的のC末端分子は、このクロマトグラフィーの非吸着および洗浄画分に回収できる。また、N末端側の分子は、溶出バッファー(20mM TrisーHC1、120mMイミダゾール、1M NaC1(pH8))を用いることにより、このカラムから回収可能である。

この非吸着および洗浄画分を、セントリフローを用いた濃縮とPBS希釈を繰り返すことにより、濃縮およびパッファー置換を行った。最終的に1mLまで濃縮し、PBSで平衡化したSuperose 12 H R 10/30カラムにアプライし、ゲルろ過した。ゲルろ過はPBSをバッファーとし、流速0.5mL/minで、220nmの波長でモニターした。この結果、主に2つのピークが現れ、第1のピークはN末端側のセレノプロテインPと切断されずに残った全長セレノプロテインPで、第2のピークはC末端側の分子であった(図3参照)。また、上記ゲルろ過工程で得られたピーク画分のSDS-PAGEの泳動像を図4に示す。

実施例6

(セレノプロテインP断片の精製方法)

セレノプロテインPのC末端断片を、より特異的かつ効率的に精製する方法として、モノクローナル抗体を利用したアフィニティークロマトグラフィーも好適な方法である。利用するモノクローナル抗体としては、セレノプロテインPのC末端側の分子を抗原として認識しうるものが望ましいが、より好適には、強い細胞死抑制活性を持つセレノプロテインP断片をマウスに免役して得られたモノクローナル抗体が用いられる。たとえばこれを臭化シアンで活性化したセファローズゲルへ結合させて作成した、モノクローナル抗体結合ゲルが好適に用いられる。このようなゲルを用いたカラムクロマトグラフィーにより、レノプロテインPを酵素で限定分解した溶液から直接、あるいは上記実施例5で調製した、Ni-NTAアガロースゲルの非吸着および洗浄画分から精製可能である。

実施例 5 と同条件で得られたNi-NTAアガロースゲルの非吸着および洗浄画分を、PBS(20mM Na² HPO⑷-NaH² PO⑷、0.15M NaCl(pH7.4))で平衡化した1.5mLのモノクローナル抗体アフィニティーカラムへ、直接ア出とした。 およそ8mLのPBSで洗浄した後、0.1Mグリシン(pH2.8)で溶出した。 溶出画分はおよそ10分の1量の1M TrisーHClで中和した。これらのロマトグラフィーにおいて、カラムの素通り画分をプールした後、Speeしたので濃縮し、PBSに対して透析した。電気泳動の結果、素通りと洗浄画分からはセレノので濃縮、透析した。電気泳動の結果、素通りと洗浄画分からはセレノプロテインPのN末端側のフラグメントが、また溶出画分からこれらを実施例3の細胞で抑制活性で比較評価するため、あらかじめそれぞれの検体に含まれるセレン含量を原子吸光度計で測定し、系の中へセレン元素1ppm等量を加えて、細胞死抑制活性を測定した。

表3

試料名	細胞死抑制活性
<u>(セレン元素1ppm</u> 等量)	(希釈倍率)
無機セレン	5000
セレノプロテインP全長分子	5000
酵素消化後	, 6000
精製N末端フラグメント	1800
精製C末端フラグメント	12000

セレノプロテイン P の C 末端フラグメントで、セレン元素 1 あたりの全長分子の数倍の細胞死抑制活性が認められた。

【図面の簡単な説明】

図 1 は、セレノプロテインPを種々のセリンプロテアーゼで限定分解した試料のSDS- P A G E 電気泳動像(代表例)を示す。レーン1:分子量マーカー、レーン2:セレノプロテインP、レーン3:セレノプロテインP+血漿カリクレイン(0時間)、レーン4:セレノプロテインP+血漿カリクレイン(2 4時間)、レーン5:セレノプロテインP+factor X I I a (0時間)、レーン6:セレノプロテインP+factor X I I a (0時間)、レーン7:セレノプロテインP+factor X I a (0時間)、レーン8:セレノプロテインP+factor X I a (2 4時間)、レーン9:セレノプロテインP+プラスミン(0時間)、レーン10:セレノプロテインP+プラスミン(2 4時間)。

図2は、セレノプロテインPを血漿カリクレインまたはプラスミンで限定分解した試料のSDS-PAGE電気泳動像を示す。A:血漿カリクレインによるセレノプロテインPの経時的限定分解、B:プラスミンによるセレノプロテインPの経時的限定分解。

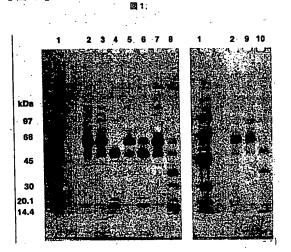
図3は、セレノプロテインP断片の精製工程におけるゲルろ過クロマトグラフィーの結果を示す。

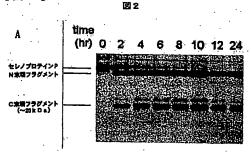
図4は、セレノプロテインP断片の精製工程におけるゲルろ過クロマトグラフィーで得られたフラクションのSDS-PAGE電気泳動像を示す。レーン1:図3のピーク2、レーン2:図3のピーク1。

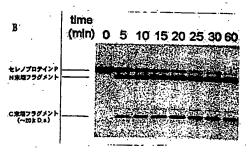
図5は、セレノプロテインP断片の精製工程におけるモノクローナル抗体アフィニティークロマトグラフィーで得られたフラクションの電気泳動像を示す。レーン1:分子量マーカー、レーン2:セレノプロテインP、レーン3:Ni-NTAクロマトグラフィーアプライ試料、レーン4:モノクローナル抗体アフィニティークロマトグラフィー吸着画分、レーン5:モノクローナル抗体アフィニティークロマトグラフィー非吸着画分。

【図2】

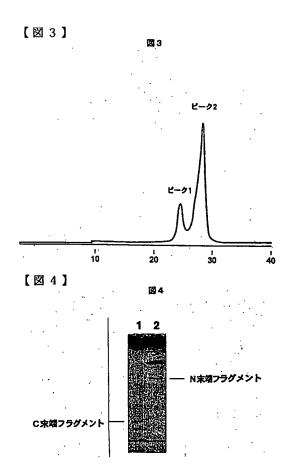
【図1】

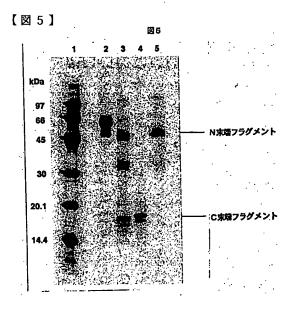






10





【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT PCT/JP02			mel application No. CT/JP02/08042
	INCATION OF SUBJECT MATTER C1 C07K14/47, C07K1/16	· ·	
According to	n Intermeticani Patent Chaeffication (IPC) er in bork cational	chasification and IPC	
B. MELD	SEARCHED		
Minimum d Int.	commentation searched (classification system followed by cla C1 ⁷ C07R14/47, C07R1/16	elfication symbols)	
Document	los searched other than minimum documentation to the excess	t that each documents are	Included in the fields sourched
Electronic d	ata base consulted during the inhernativesal meanth (name of d	ta burn and, when practi	cubis, spanch leanns word)
MĐI (DIALOG), BIOSIS(DIALOG)		
C. DOCU	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	 	
Category*	Charles of document, with indication, where appropri	set, of the relayant passag	pas Referent to claim No.
	NO 00/31131 Al (Juridical Found Sero-Therapeutic Research Instit 02 June, 2000 (02.06.00), s EP 1132401 Al 6 JP 200		o- 1-7
А	RIMENO S. et al., Isoforms of se rat plasma. The Journal of Biolo 1996, Vol.271, No.26, pages 1576	gical Chemistr	in 1-7 Y,
А	RBAD R. et al., Selenium and amino acid composition of selenoprotein P, the major selenoprotein in rat serum. The Journal of Biological Chemistry, 1990, Vol.265, Bo.29, pages 17899 to 17905		
X Paris	or documents are listed in the continuation of Box C.	See parent (handly assuex	·
"A" document consider to determine the document color to document	companies of cheef documents are published on or chert che intermediated (Eliep "A" are which many those documents are published on or chert che intermediated (Eliep "A" are which many those documents or published on or other categories of the cheef cheef or categories or other categories of the cheef cheef of cheef documents of cheef documents of cheef or categories of the cheef of	priority dute and not in con- tradictional the principle or document of particular rela- costileted movel or control step when the document in document of particular rela- costileted in baselon on in-	there is between the production of the conflict with the expellenties but chief to friend with the expellenties but chief to freely well-up the framework of the chief to be considered as the travelse on the considered as the travelse on the considered with the chief to the conflict of
Date of the s	cited completion of the international search ontober, 2002 (15.10.02)	of mailing of the leternol 29 October, 20	
Japan	nese Patent Office	orbod officer	
Pacsimile No	SA/210 (second sheet) (July 1998)	shone No.	

••	INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No.		
:	PCT/JI		02/08042	
C (Codime	dom) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Оптанту	Citation of document, with indication, where appropriate, of the scien	my bandara .	Relevant to claim No.	
. .	HOTCHNIK F.A. et al., Multiple selenocysi content of selenoprotein P in rats. Journ Inorganic Biochemistry, 1990, Vol.40, No pages 265 to 269	al of	1-7	
A	PERSSON-MOSCHOS M. et al., Selemoprotein as a biochemical marker of selenium state Analyst, 1995, Vol.120, Ho.3, pages 833	15.	7	
A	ARESSON B. et al., Purification of selent P from human plasma. Biochimica et Bioph Acta, 1994, Vol.1204, No.2, pages 243 to	vsica	7	
A	ARTHEL G.E. et al., Protection by seleno P in human plasma sgainst peroxymitrite- oxidation and nitration.Biol.Chem., 1998, Bos. 8 to 9, pages 1201 to 1205	nedisted	7	
•			٠.	
		•		
٠٠				
			:	
• •				

.•	至政策变集会	EERESS P	CT/JP01	/08042
A. 発明のJ	は十ち分析の分類(回数特許分類(I PC))			
Int. Cl'	COTE 14/47, COTE 1/16			
B. 関立を付 検支を行った	7った分野 水不足染料(国双特許分類(IPC))			·
Int. Ci'	COTE 14/47, COTE 1/16		.:	
是小田野野以	りの資料で開査を行った分野に含まれるもの			
				<i>:</i>
	日した電子ゲータベース (データベースの名称、	調査に使用した用語)		
WPI (DIAL	OC), BIOSIS (DIALOC)			
引用文献の	5と窓められる文献			関連する
<i>⊅∓⊴∛⊷</i> ∗ A	明月文献名 及び一体の首所が顕演すると 〒0 00/31:131 A1 (財団法人化学及血行 & EP 1132401 A1 & JP 2000-583957	療法研究所) 2000. 0		情求の範囲の番号 1-7
A	HIMENO S. et al. Isoforms of seleno The Journal of Biological Chemist p. 15769-15775			1-7
区標の統	をにも文献が序巻されている。	[] <pre>//pubzzs</pre>	11 to Made at Dr	MAAR .
* 引用支款(A) 特に既 もの 「B」国際出 以後に 「L」優先権	カタナゴリー カタナゴリー 連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す 個日前の出版または特許であるが、国際出層日 な技されたもの 生態に製造を視起する文献又は他の文献の発行	の日の後に公産さ 「丁」国際出頭日又は自 出頭と予用するも の選択のために与 「X」特に関連のある方 の新娘性又は進歩	られた文献 E先日後に公表: のではなく、! 用するもの 「献であって、! 性がないと考:	された文献であって 発明の原理文は短輪 当技文献のみで発明 たちれるもの
(2) (4) (2) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1) (1)	くは他の特別な理由を確立するために引用する 理由を付す) よる開味、使用、風邪等に含及する文献 双月的で、かつ優先権の主張の基礎となる出版	よって進歩性がな 「&」製一パテントファ	集者にとって! いと考えられ ・ミリー大飲	見例である超 合せ に ろもの
国際調査を完	15. 10. 03	国際調査報告の発送日	29.10	J.U2
日本1	の名称及びあて先 取物計庁(ISA/IP) 存役券号100-8915 B午代田区政が開ニ丁日4参3号	特許庁審査官(権疑の表 富永 みどり 電話寄号 08-858	(影	4N 91.53

株式PCT/15A/210 (第2ページ) (1998年7月)

•	国際現実報告 国際出席番号 PCT/JP(2/08042
	資流すると含められる文献	
引用文鉄の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の役所が関連すると合は、その関連する性所の表示	関連する 数本の範囲の参手
A	READ R. et al. Selenium and amino acid composition of selenoprotein P, the major selenoprotein in rat sarum. The Journal of Biological Chemistry, 1990, Vol. 265, No. 29, p. 17899-17906	1-7
A	MOTCHNIK P. A et al. Multiple selemocysteine content of selemogratein P in rats. Journal of Inorganic Biochemistry, 1990, Vol. 40, No. 3, p. 265-269	1-7
A .	PERSSON-MOSCHOS M. et al. Selenoprotein P in serum as a blochemical sarker of selenium status. Analyst, 1995, Vol. 120, No. 3, p. 833-636	7
A	ARESSON B. st al. Purification of selemoprotein P from human plasma. Blochinica et Blophysica Acta, 1994, Vol. 1204, No. 2, p. 243-249	7
A	ARTEEL G.B. et al. Protection by selemoprotein P in human plasma against percaynitrite-mediated oxidation and mitration Biol. Chem., 1993, Vol. 379, No. 8-9, p. 1201-1205	7
		İ
		1
		"
	j	
		· ·
	ľ	
	•	
	1.	
•		
		1
	· _ · _	

株式PCT/ISA/210 (第2ページの設を) (1998年7月)

フロントページの続き

(72)発明者 前田 浩明

熊本県熊本市壺川1丁目1-12 栄久ハイツ

(72)発明者 髙橋 和彦

北海道札幌市北区北37条西8丁目2番30-409

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。